

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 日
Date of Application:

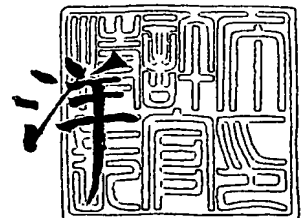
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 0 0 9 8 6
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 0 0 9 8 6]

出 願 人 三 菱 ウ ェ ル フ ェ ー マ 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 2 1 7 2

【書類名】 特許願
【整理番号】 YK03028
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K009/127
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株
 式会社 東京オフィス内
 【氏名】 田川 俊明
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株
 式会社 東京オフィス内
 【氏名】 上田 真奈美
【特許出願人】
 【識別番号】 000006725
 【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100082511
 【氏名又は名称】 高柳 昌生
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 013114
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0114651

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

水溶性物質を内腔に封入し、粒径が 300 nm 以下及びトリグリセロールを含有したリポソーム。

【請求項 2】

水溶性物質を内腔に封入し、粒径が 200 nm 以下及びトリグリセロールを含有したリポソーム。

【請求項 3】

水溶性物質が、水溶性低分子化合物、蛋白質、核酸類、多糖類及び／又は蛍光物質である請求項 1 又は 2 に記載のリポソーム。

【請求項 4】

水溶性物質が、水溶性低分子化合物及び多糖類である請求項 1 又は 2 に記載のリポソーム。

【請求項 5】

水溶性物質が、水溶性低分子化合物である請求項 1 又は 2 に記載のリポソーム。

【請求項 6】

水溶性低分子化合物がシスプラチン、カルボプラチン、ゲムシタビン又は Ara-C である請求項 3 から 5 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 7】

多糖類がキトサン誘導体又はカルボキシル基を有する多糖類である請求項 3 又は 4 に記載のリポソーム。

【請求項 8】

カルボキシル基を有する多糖類がカルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン又はコンドロイチン硫酸である請求項 7 に記載のリポソーム。

【請求項 9】

トリグリセロールがトリオレインである請求項 1 から 8 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 10】

水溶性化合物の内腔への封入率が 60 % 以上である請求項 1 から 9 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 11】

水溶性化合物の内腔への封入率が 70 % 以上である請求項 1 から 9 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 12】

リガンド及び／又はポリアルキレングリコールを有する請求項 1 から 11 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 13】

リガンド及びポリアルキレングリコールを有する請求項 1 から 11 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 14】

リガンドを有する請求項 1 から 13 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 15】

リガンドがターゲット細胞又はターゲット分子に結合するものである請求項 12 から 14 のいずれかに記載のリポソーム。

【請求項 16】

リガンドが抗体である請求項 12 から 15 に記載のリポソーム。

【書類名】明細書

【発明の名称】リポソーム

【技術分野】

【0001】

本発明は、リポソーム内腔への水溶性物質の封入率が60%以上、粒径が300nm以下のトリグリセロールを含有したリポソームに関する。また、粒径が200nm以下のトリグリセロールを含有したリポソームに関する。

【背景技術】

【0002】

リポソームは、脂質2重膜でできた閉鎖小胞であり、リポソーム内腔の水層に水溶性物質を保持し、脂質膜中に脂溶性物質を保持することが出来る。また、用途により、数10nm程度の小さい一枚膜リポソーム(SUV)、数100nm程度の大きい一枚膜リポソーム(LUV)又は多重層リポソーム(MLV)等種々の形態及び粒径のリポソームを作製することが出来る。

【0003】

また、リポソームは生体由来の生分解性脂質で構成されていることから、ドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用が提唱され、近年においては、リポソーム表面をポリエチレングリコールで修飾した生体内安定性を改善したリポソームの研究や、抗体等のリガンドを結合した機能化リポソームの研究もなされている。

【0004】

リポソームのDDSへの実用化を考える場合には、内腔に封入する水溶性物質のリポソーム化効率(リポソームへの水溶性物質の封入率をいう。以下「封入率」と記載することがある)、リポソームの形態及び粒径を考慮することが重要である。

【0005】

高い封入率を得る方法としては、シュナイダーのダブルエマルジョンを介した方法(W/O/W法)が挙げられる(特許文献1)。これは、水と不混和性の有機溶媒にリン脂質あるいはリン脂質とコレステロールを溶解し薬剤水溶液と混和し、この混合液を乳化することでwater in oil (W/O) エマルジョンを形成し(1次乳化)、さらにこのエマルジョンを水相に移すことでwater in oil in water (W/O/W) エマルジョンを形成する(2次乳化)。このW/O/Wエマルジョンから溶媒を除去し、リポソームを形成する方法である。この方法に従うとインシュリン、トリプシン、アクチノマイシンD、アラビノースシトシン等を50~80%という高い封入率でリポソーム化することが出来る。この方法において使用出来る脂質として、レシチン、フォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等のリン脂質、コレステロール等のステロールに加え、ステアリルアミン等リンを含有しない脂質、ポリエトキシレート化された脂肪酸アミド等に加え複合脂質、グリセライド、セライド、エストライドが列挙されている。一方、リポソームのDDSへの実用化を考える場合に重要となる、リポソームの形態及び粒径についてはなんら言及されていない。

【0006】

また、中性脂肪であるグリセライドをリポソームの構成成分として用いることは一般に行われていないが、Kimらは、グリセライドの一種であるトリオレインを構成成分として用いることで、通常のリポソームに比べて、非常に粒径の大きいリポソーム(非特許文献1)や、巨大なリポソームが多く的小区画に分かれたマルチコンパートメントリポソーム(非特許文献2)を作製し、封入率の高いリポソームを得ている。

【0007】

一方、リポソームのような微粒子をDDSに応用する場合、微粒子の粒径がDDS機能に大きな影響を与えることが知られている。例えば癌では、癌組織の血管は正常組織の血管と異なりサブミクロンサイズのポアを有しており(非特許文献3)、微粒子が血管を超えて腫瘍組織に到達するには、そのカットオフサイズよりも小さい必要がある。実際、血管内に各種サイズのリポソームを投与して腫瘍へ到達性を比較した実験(非特許文献4)

では 200 nm 以下のリポソームで良好な腫瘍集積性を認めている。また、微粒子の経口吸収に関する研究で、Janiら（非特許文献 5）は、消化管粘膜から取り込まれる微粒子の割合は粒径に依存していることを示した。小さな粒子ほど吸収されやすく、粒子サイズが 300 nm 以下になると経口投与した粒子が血液中にも観察された。

【0008】

このように、リポソームのような微粒子を DDS に応用する為には、粒径をコントロールして小サイズ化することが重要であり、粒径に関する検討がなされてきた。同時に、効率よくリポソームに目的物質を封入するための検討もなされてきた。しかしながら、従来技術では、リポソームの粒径を小さくすることは困難であり、さらに、リポソームの粒径を小さくし、高い封入率を両立することは困難であった。

【特許文献 1】US 4 224 179 号特許公報

【非特許文献 1】Biochim Biophys Acta, 646, 1 (1981)

【非特許文献 2】Biochim Biophys Acta, 728, 339 (1983)

【非特許文献 3】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 4607-4612

【非特許文献 4】Inter. J. Pharm. 190 (1999) 49-56

【非特許文献 5】J. Pharm. Pharmacol 42(1990)821-826, Inter. J. Pharm. 86 (1992) 239-246

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、リポソームを DDS として応用する際に重要であるリポソーム内腔への水溶性物質の封入率が 60% 以上、粒径が 300 nm 以下の小さいリポソームを提供することにある。また、粒径が 200 nm 以下の小さいリポソームを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

かかる従来の問題点を解決する為に誠意検討した結果、驚くべきことに、リポソーム形成脂質として少量のトリグリセロールを加えることで粒径が小さく、封入率の高いリポソームを容易に作製出来ることを見出して、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 水溶性物質を内腔に封入し、粒径が 300 nm 以下及びトリグリセロールを含有したリポソーム。

(2) 水溶性物質を内腔に封入し、粒径が 200 nm 以下及びトリグリセロールを含有したリポソーム。

(3) 水溶性物質が、水溶性低分子化合物、蛋白質、核酸類、多糖類及び／又は蛍光物質である上記 1 又は 2 に記載のリポソーム。

(4) 水溶性物質が、水溶性低分子化合物及び多糖類である上記 1 又は 2 に記載のリポソーム。

(5) 水溶性物質が、水溶性低分子化合物である上記 1 又は 2 に記載のリポソーム。

(6) 水溶性低分子化合物がシスプラチン、カルボプラチン、ゲムシタビン又は Ara-C である上記 3 から 5 のいずれかに記載のリポソーム。

(7) 多糖類がキトサン誘導体又はカルボキシ基を有する多糖類である上記 3 又は 4 に記載のリポソーム。

(8) カルボキシ基を有する多糖類がカルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン又はコンドロイチン硫酸である上記 7 に記載のリポソーム。

(9) トリグリセロールがトリオレインである上記 1 から 8 のいずれかに記載のリポソーム。

(10) 水溶性化合物の内腔への封入率が 60% 以上である上記 1 から 9 のいずれかに記載のリポソーム。

(11) 水溶性化合物の内腔への封入率が 70% 以上である上記 1 から 9 のいずれかに記

載のリポソーム。

(12) リガンド及び／又はポリアルキレングリコールを有する上記1から10のいずれかに記載のリポソーム。

(13) リガンド及びポリアルキレングリコールを有する上記1から10のいずれかに記載のリポソーム。

(14) リガンドを有する上記1から12のいずれかに記載のリポソーム。

(15) リガンドがターゲット細胞又はターゲット分子に結合するものである上記1から13のいずれかに記載のリポソーム。

(16) リガンドが抗体である上記11から14に記載のリポソーム。

【発明の効果】

【0012】

上記のようにリポソーム形成脂質として少量のトリグリセロールを加えることによってリポソーム内腔への水溶性物質の封入率が60%以上、粒径が300nm以下の小さいリポソームを提供することが出来る。また、粒径が200nm以下の小さいリポソームを提供することが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】

本発明におけるリポソームの粒径は、平均粒径が300nm以下、好ましくは平均粒径が200nm以下のものである。また、本発明におけるリポソームは粒径が1μm以上のリポソームが5%以上混入しないもの、好ましくは1%以上混入しないものであればよい。より好ましくは粒径が350nm以上のリポソームが20%以上混入しないもの、さらに好ましくは粒径が350nm以上のリポソームが10%以上混入しないものである。さらに好ましくは粒径が250nm以上のリポソームが10%以上混入しないもの、最も好ましくは粒径が250nm以上のリポソームが混入しないものである。

【0015】

ここで、リポソーム粒径の測定法としては、例えば、動的光散乱法を用いることが出来る (Liposome Technology, 2nd Edition Vol.1 Chapter 15 p254-269 (1993); CRC Press, Edited by Gregory Gregoriadis)。また、粒径が著しく不均一なリポソームの場合は動的光散乱法で測定が困難となり、大粒径リポソームの混入が正確に反映されない場合があるため、そのような場合は、例えば、透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法 (Scanning Electron Microscopy Part 3, (1983), p1329-1337)、凍結電子顕微鏡撮影 (Liposome Technology, 2nd Edition Vol.2 Chapter 14 p250-252 (1993); CRC Press, Edited by Gregory Gregoriadis) 又は原子間力顕微鏡 (Thin solid films 273 (1996) 297-303) により粒径を観察し、リポソームの粒径を測定することが出来る。

本発明におけるリポソームの形態は、特に限定されるものではないが、例えば、小さな一枚膜リポソーム (SUV)、大きな一枚膜リポソーム (LUV)、多重層リポソーム (MLV) 等が挙げられる。

【0016】

本発明におけるトリグリセロールとは、トリカプロイン (Tricaproin)、トリカプリリン (Tricaprylin)、トリカプリン (Tricaprin)、トリミリスティン (Trimyristin)、トリパルミチン (Tripalmitin)、トリリノレイン (Trilinolein)、トリオレイン (Triolein) であるが、好ましくはトリオレイン (Triolein) である。ここで、トリグリセロールを添加する際の添加量としては、総脂質の1~15mol%、好ましくは2~7mol%、更に好ましくは3~6mol%である。

【0017】

また、本発明におけるリポソームを形成し得る脂質としては、例えば、天然フォスファチジルコリン、合成フォスファチジルコリン、天然フォスファチジルエタノールアミン、合成フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチ

ジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジン酸等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質又はグリセロ糖脂質等の糖脂質等が挙げられる。また、天然フォスファチジルコリンとしては、卵黄ホスファチジルコリン (EPC) 又は大豆ホスファチジルコリンが挙げられ、合成フォスファチジルコリンとしては、ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC)、ジミリストイルフォスファチジルコリン (DMPC)、ジステアロイルフォスファチジルコリン (DSPC) 又はジオレオイルフォスファチジルコリン (DOPC) 等が挙げられ、天然フォスファチジルエタノールアミンとしては、卵黄ホスファチジルエタノールアミン等が挙げられ、合成フォスファチジルエタノールアミンとしては、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等が挙げられ、フォスファチジルグリセロールとしては、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール等が挙げられる。これらの脂質は単独又は2種以上、あるいはこれらの脂質とコレステロール等の非極性物質と組み合わせ用いられることもある。また、リン脂質とコレステロールを組み合わせ用いる場合はそのモル比は2:1から1:1程度が好ましいが、比率はこれに限定されない。

【0018】

さらに、本発明におけるリポソームには、上記の脂質成分に加え、必要に応じて乳化剤を混合することが出来る。乳化剤としては、オクチルグルコシド又はコール酸等が挙げられる。

【0019】

また、本発明におけるリポソームの作成方法としては、本発明が達成されるものであれば、いかなる既知の作製方法を用いても良いが、好ましくはエマルジョンを介した方法が挙げられる。具体的には、逆相蒸発法又はダブルエマルジョンを介した方法 (W/O/W 法) を用いることが出来る。例えば、まず水と不混和性の有機溶媒にリン脂質あるいはリン脂質とコレステロールを溶解し、薬剤水溶液と混和し、この混合液を乳化することで water in oil (W/O) エマルジョンを形成し (1次乳化)、さらにこのエマルジョンを水相に移すことで water in oil in water (W/O/W) エマルジョンを形成する (2次乳化)。さらに、2段階の乳化で得られた W/O/W エマルジョンから溶媒を除去することでリポソームを形成することが出来る。また、別の形態としては転相乳化法 (J. Colloid Interface Sci., 94, 362 (1983)) によりダブルエマルジョンを作製しリポソーム化することが出来る。さらに、別の形態としては1段階乳化法 (特開昭59-193901) により得られたダブルエマルジョンからリポソームを作製しても良く、好ましくは2段階乳化で得られたダブルエマルジョンからリポソームを作製する方法等が挙げられる。

【0020】

ここで、2段階乳化のダブルエマルジョンからリポソームを作製する場合を例にとり、詳細に説明するが本発明はこれに限定されるものではない。

【0021】

まず、一次乳化に用いる溶媒は水不溶性又は水難溶性の溶媒を用いることができ、例えばクロロホルム、ヘキサン、エーテル類、ベンゼン、エステル類、フロン類、液化CO₂、ジクロロメタン、四塩化炭素等が挙げられる。これらは単独又は組み合わせ用いることが出来る。溶媒を組み合わせる場合には、溶媒相の比重がリポソームに封入すべき水溶液の比重に近いように混合比を調整することが望ましい。

【0022】

溶媒にリポソーム構成脂質あるいは必要に応じてリガンド結合用脂質及び/又は乳化剤を加え、さらに封入すべき水溶性物質を含む水相を添加する。水相はリン酸緩衝液のような緩衝液を用いることが出来る。また、必要に応じて塩化ナトリウムやショ糖、乳糖等低分子の糖を加えて浸透圧及び比重を調整することが出来る。水相と溶媒相を混合する時、水相は溶媒相より少ないことが必要である。好ましくは溶媒1容に対して0.01容から0.5容以下、より好ましくは0.1容から0.4容、さらに好ましくは0.2容から0.3容を用いる。混合液を乳化しW/Oエマルジョンを作製する (一次乳化)。乳化はいかなる乳化技術を用いても良いが、例えば、超音波照射による乳化、激しい攪拌、ホモジナイザー、噴霧あるいは高圧乳化装置を用いて行なうことが出来る。超音波照射

はバス型のものやプローブ型あるいは連続型を用いることが出来る。また高圧乳化装置はナノマイザー（吉田機械興業）あるいはマイクロフルイダイザー（みずほ工業）の名称で市販されており、これらの装置を用いることができ、好ましくは超音波照射が挙げられ、より好ましくは高圧乳化装置が挙げられる。

【0023】

また、一次乳化においては、乳化する温度をリポソーム構成脂質の相転移温度より高い温度で行なうことが望ましい。例えばリン脂質としてDPPCを用いる場合は42℃以上で行なうことが望ましい。

【0024】

次に、得られたW/Oエマルジョンを攪拌しながら第二の水相に添加することによってダブルエマルジョン（W/O/W）を形成する。第二の水相は純水でもよいが緩衝液を用いることが出来る。さらに適宜、塩化ナトリウム等の無機塩やショ糖、乳糖等低分子の糖を加えて浸透圧及び比重を調整することが出来る。得られたダブルエマルジョンをさらに攪拌しながら、溶媒を除去することでリポソームを形成する。溶媒の除去は、ダブルエマルジョンに空気、窒素ガスやアルゴンガスのような不活性ガスを吹きつけながら、減圧することで行なう。必要に応じて溶液の温度を40℃～60℃にして行なうことも出来る。このようにして得られたリポソーム溶液はそのまま、又は、限外濾過膜やゲル濾過により封入されなかった水溶性物質を除去した後に用いることも出来る。

【0025】

また、本発明においては、必要があれば、リガンドやポリエチレングリコールをリポソーム表面に結合し使用することが可能である。

【0026】

本発明のリガンドとしては、ターゲット細胞又はターゲット分子に結合するものが挙げられる。ここで、ターゲット細胞とは、リポソームを用いて封入した物質を送達させようとする細胞であり、例えば癌細胞、癌組織の血管内皮細胞、癌組織の間質細胞等が挙げられる。また、ターゲット分子とは、ターゲット細胞の細胞質内の分子、核内の分子、あるいは細胞表面の分子等いかなる分子でも良いが、好ましくは細胞表面の分子である。ターゲット分子の別の形態として、細胞から放出された分子が挙げられる。例えば、癌細胞や癌組織の間質細胞の分泌物や構築物であってもが挙げられ、具体的には腫瘍マーカーや細胞間の構築物等が挙げられる。

【0027】

本発明のリガンドとは、上記の通りターゲット細胞又はターゲット分子に結合するものであって、例えば、各種抗体、線維芽細胞成長因子（FGF）、上皮細胞成長因子（EGF）等の成長因子又は増殖因子等のタンパク質が挙げられるが、好ましくは抗体が挙げられる。また、抗体としては各種動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒトマウスキメラ抗体又はヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体が挙げられるが、好ましくはヒトモノクローナル抗体が挙げられる。さらに好ましくは癌反応性のヒトモノクローナル抗体が挙げられる。

【0028】

リポソームにリガンドを結合する際には、まず、リガンドを結合する為の脂質誘導体を加えリポソーム化し、そのリポソームに当該脂質誘導体に反応しうるリガンドを添加することにより作製することが出来るが、作成方法はこれに限定されない。また、脂質誘導体としては、リガンド結合リポソームを作製する為に用いられるいかなる脂質誘導体を用いることも出来るが、例えば、 ϵ -マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等を用いることが出来る。

【0029】

また、リガンド結合用脂質を組み込んだリポソームを作製した後、必要に応じてリガンドを結合することが出来る。リガンドはリガンド結合用脂質と結合しうる官能基を有するものであればいかなるものでも良く、 ϵ -マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンのようにマレイミド基を有するリガンド結合用脂質の場合は、

リガンドにチオール基を有すれば良い。

【0030】

また、別の実施形態として、先にリガンドを結合した脂質を合成し、これをリポソーム形成脂質と混合しリポソーム化することが出来る。

【0031】

さらに別の形態として、リガンド結合用脂質を組み込むことなくリポソームを作製した後、別途、リガンドを結合した脂質を作製しリポソームと混合することによりリガンド結合リポソームを作製することができ (Biochimica Et Biophysica Acta; Volume 1513, Issue 2, 2001, Pages 207-216)、好ましくはリガンド結合用脂質を組み込んだリポソームを作製した後、リガンドを結合し、リガンド結合リポソームを作製する方法等が挙げられる。

【0032】

本発明におけるポリアルキレングリコールとしては、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール等が挙げられ、好ましくはポリエチレングリコールが挙げられる。ここで、ポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量が2,000~7,000ダルトン程度のものが挙げられ、好ましくは約5,000ダルトン程度のものが挙げられる。

【0033】

ポリエチレングリコール (PEG) 等をリポソームに結合する際には、例えば、EP 526700号公開公報に記載のチオール基を有するPEGを、 ϵ -マレイミドカプロイルジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンを有するリポソームと結合することで容易にPEG化リポソームを作製することが出来る。

【0034】

本発明において、水溶性物質の内腔への封入率としては、60%以上であることが挙げられ、好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、最も好ましくは80%以上であることが挙げられる。

【0035】

本発明において、水溶性物質としては、水溶性低分子化合物、蛋白質、核酸類、多糖類又は蛍光色素等が挙げられる。水溶性低分子化合物としては、例えばシスプラチン、カルボプラチン、ゲムシタビン又はAra-C等が挙げられる。蛋白質としては、アルブミン、サイトカイン類、腫瘍抗原類又は毒素類が挙げられる。サイトカイン類としてはTNF、インターフェロン又はインターロイキン等が挙げられ、腫瘍抗原類としてはHer-2、CEA又はAFP等が挙げられ、毒素類としてはジフテリアトキシン又はリシンA鎖等が挙げられる。核酸としては、TNFなどのサイトカインをコードしたDNA類、p53などの腫瘍抑制遺伝子類をコードしたDNA類、チミジンキナーゼなどの自殺遺伝子類をコードしたDNA類、アンチセンスRNA又はRNAi (RNA interference) 作用を有するRNA類等が挙げられる。

【0036】

本発明における多糖類としては、キトサン誘導体又はカルボキシル基を有する多糖類等が挙げられる。カルボキシル基を有する多糖類としては、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン又はコンドロイチン硫酸が挙げられ、好ましくはカルボキシメチルセルロースが挙げられる。

【0037】

本発明における蛍光色素としては、放射性元素、例えばインジウム、テクネシウムのイメージング薬剤や、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼの酵素、ガドリニウムのMRI造影剤、ヨウソのX線造影剤、CO₂の超音波造影剤、ユーロピウム誘導体、カルボキシフルオレッセインの蛍光体又はN-メチルアクリジウム誘導体の発光体が挙げられる。

【0038】

また、水溶性低分子化合物、蛋白質、核酸類、多糖類又は蛍光色素等はそれぞれ単独でリポソーム内腔に封入されていてもよく、これらが組み合わされてリポソーム内腔に封入

されていても良い。例えば、水溶性低分子化合物及び多糖類が組み合わされてリポソーム内腔に封入することが挙げられる。

【0039】

なお、水溶性物質をリポソームに導入する方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法がいずれも適用可能である。例えば、リポソーム形成時に水溶液として添加してリポソーム内部に封入してもよい。また、リポソーム形成後、ベジクル内外にpH勾配等の濃度勾配を形成し、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な薬剤をリポソーム内部に取り込ませる方法 (Cancer Res., 49, 5922, 1989; BBA, 455, 269, 1976) 等を用いることも出来る。

【0040】

本発明で得られたリポソームは、例えば、EP 526700号公開公報又はEP 520499号公開公報に記載の方法により製剤化することができ、該複合体を、癌等の各種疾患の治療のために、血管内投与、膀胱投与、腹腔内投与、局所投与等の方法で患者に投与することが出来る。

【実施例】

【0041】

以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0042】

実施例 1

卵黄ホスファチジルコリン (EPC) 及びコレステロールは、日本油脂社より入手した。トリオレイン (Triolein) 及び5 (6)-カルボキシフルオレセイン (5 (6)-Carboxyfluorescein) はシグマ社より購入した。

【0043】

W/O emulsionの調製 (1次乳化)

EPC 59.7 mg ($81.4 \mu\text{mol}$) とコレステロール 15.75 mg ($40.7 \mu\text{mol}$) にトリオレイン $4.1 \mu\text{mol}$ をジクロロメタンに溶解後、窒素気流下に乾燥し乾燥脂質混合物を調整した。

【0044】

調製した脂質乾固物を、クロロホルム/ヘキサン (1:1、V/V) 混液 1 mL に溶解した。この脂質溶液に5 (6)-Carboxyfluorescein (CF) 溶液 (PBSに溶解した 8 mM CF $200 \mu\text{L}$ に 70% シュクロース $33 \mu\text{L}$ を加えたもの: シュクロースの終濃度 10%) を添加した。これを 55°C の湯浴で温めながら、ホモジナイザー (ポリトロン; KINEMATICA GmbH, PCU1, Ser nr 5239) を用いて、出力 5 で 20 分間予備乳化を行なった。次に、プローブ型ソニケーター (Branson Sonifier 450) を用いて Power = 1; cycle = 50 % で 30 分間超音波照射することで 1 次乳化を行なった。

【0045】

W/O/W emulsionの調製 (2次乳化)

バイアルビンに、分散相となる 10% シュクロース水溶液を入れて 55°C に合わせ、攪拌しながら、一次乳化サンプルを 10 分間かけて滴下した。W/O emulsion が分散相の中に全部出たところで、窒素を 15 mL/min でふきつけながら真空ポンプで減圧することにより、溶媒を除去した。サンプルが大体透明になったのを確認した後、さらに 100 mmHg まで減圧し、有機溶媒のトレースを除去した。生成したリポソームサンプルは、15 mL のファルコンチューブに移し氷上で保管した。

【0046】

封入率の算出

蛍光色素の封入率を下記のように算出した。すなわち、リポソーム原液 $50 \mu\text{L}$ に 4% SDS/PBS 溶液を $50 \mu\text{L}$ 加え、55°C で 2 分加温後、バス型ソニケーターで 30 秒間の超音波処理を二回繰り返した。軽く遠心し溶液を集めた後、2% SDS/PBS を $900 \mu\text{L}$ 加え、同様に超音波処理を 2 度繰り返した。可溶化したリポソームサンプルを 20°C、15,000 rpm で 20 分間遠心して、上清の 492 nm の吸光度を測定した。この値を CF の検量線から定量し全 CF 濃度 ([ALL

]) を算出した。

【0047】

非封入CF量はウルトラフリーを用いて測定した。すなわち、PBS希釈したリポソーム溶液300 μ Lを限外濾過スピナラム (Ultrafree-0.5、Millipore Biomax-100)に入れて、0℃、5000 rpmで濾過液の液量が約200 μ L程度になるまで遠心し、得られた濾過液100 μ Lに4% SDS/PBSを100 μ L加え、さらに2% SDS/PBSを800 μ L加えてよく混合し、492 nmにおける吸光度を測定した。同様に検量線から非封入CF濃度 ([ALL]) を算出した。封入率 (%) は $([ALL]-[PASS]) \times 100/[ALL]$ で算出した。

【0048】

動的光散乱法による粒径測定

リポソーム溶液をPBSで希釈し、動的光散乱法 (Photal ELS-800 大塚電子)により粒径を測定した。粒径はキュムラント法により算出された平均粒径で表示した。

【0049】

トリオレインを含有する脂質を用いて、ダブルエマルジョンを介する方法によりリポソームを形成させ、動的光散乱法で測定すると、平均粒径が181 nm、封入率は69%のリポソームを得ることができた。

【0050】

実施例 2

DPPC/Chol/MC-DPPE (モル比18:10:0.5) からなる脂質混合物PL-M1 (日本油脂社) 60mgに、コレステロールの10mol%に相当する3.28 μ molのトリオレインを加え、ジクロロメタンに溶解した。乾固後、実施例1と同様にクロロホルム/ヘキサン (1:1、V/V) 混液1 mLに溶解し、CF溶液を加えた。さらに一次乳化における超音波照射時間を5分、10分、20分、30分、40分及び45分にする以外は実施例1と同様にしてダブルエマルジョンを介してリポソームを作製した。その結果、W/Oエマルジョンの作製時の超音波照射時間を延ばすにつれ最終的に得られるリポソームの粒径が小さくなり、20分程度の超音波照射で200 nm以下のリポソームが形成した (図1A●)。その時のCFの封入率を図1B (●) に示す。

【0051】

この結果、トリオレイン含有リポソームのCF封入率は、処理時間によらず、およそ60%以上であることが示された。

【0052】

対照例 1

実施例2の対照例として、トリオレインを含有しない脂質組成で同様にリポソームを作製した。20分程度の超音波照射でリポソームの粒径は200 nm以下になるものの、トリオレイン含有リポソームに比べて封入率が30%から60%程度と低かった。

【0053】

この結果より、照射時間毎の変動幅も大きく作製時の制御も容易ではないことが示された。

【0054】

実施例 3

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol、Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリオレインを添加した脂質混合物を用い、超音波照射時間を20分にする以外は、実施例2と同様にしてリポソームを形成し、リポソームの粒径と封入率を測定した。

【0055】

その結果、リポソームの粒径は174 nmでありCFの封入率は73%であった。

【0056】

さらに電子顕微鏡による観察を行なった。コロジオン膜付メッシュをリポソーム試料に接触させた。脱塩水で希釈後、ろ紙で水分を吸着した。直ちに2%酢酸ウラニル染色液に接触し (約10秒)、再度ろ紙で水分を吸収した。自然乾燥させた後、透過型電子顕微鏡

(日立H-9000NA、100 kV、対物絞り3)で観察したところ、図2Aに見られるように小粒径のリポソームが観察された。

【0057】

対照例2

実施例3の対照例としてトリオレインを含有しない脂質組成で同様にリポソームを作製した。

【0058】

その結果、リポソームの粒径は239 nmでありCFの封入率は55%であった。さらに電子顕微鏡で形態を観察したところ、図2Bに見られるように大粒径のリポソームの混在が認められた。

【0059】

実施例3及び対照例2の結果より、トリオレインを添加することにより、高い封入率でサイズの小さなリポソームが得られることが示される。

【0060】

実施例4

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリカプロイン (Tricaproin : シグマ社) を添加した脂質混合物を用い、実施例3と同様にしてリポソームを形成し、リポソームの粒径と封入率を測定した。

【0061】

その結果、粒径は156.6 nmでありCFの封入率が59%のリポソームが得られた。

【0062】

実施例5

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリカプリリン (Tricaprylin : シグマ社) を添加した脂質混合物を用い、実施例3と同様にしてリポソームを形成し、リポソームの粒径と封入率を測定した。

【0063】

その結果、粒径は178.5 nmでありCFの封入率が65%のリポソームが得られた。

【0064】

実施例6

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリカプリン (Tricaprin : シグマ社) を添加した脂質混合物を用い、実施例3と同様にしてリポソームを形成し、リポソームの粒径と封入率を測定した。

【0065】

その結果、粒径は169.7 nmでありCFの封入率が65%のリポソームが得られた。

【0066】

実施例7

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリミリスチン (Trimyristin : シグマ社) を添加した脂質混合物を用い、実施例3と同様にしてリポソームを形成し、リポソームの粒径と封入率を測定した。

【0067】

その結果、粒径は170.5 nmでありCFの封入率が60%のリポソームが得られた。

【0068】

実施例8

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリパルミチン (Tripalmitin : シグマ社) を添加した脂質混合物を用い、実施例3と同様にしてリポソームを形成し、リポソームの粒径と封

入率を測定した。

【0069】

その結果、粒径は170.5 nmでありCFの封入率が65%のリポソームが得られた。

【0070】

実施例9

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリリノレイン (Trilinolein: シグマ社) を添加した脂質混合物を用い、実施例3と同様にしてリポソームを形成し、リポソームの粒径と封入率を測定した。

【0071】

その結果、粒径は172.7 nmでありCFの封入率が57%のリポソームが得られた。

【0072】

実施例10

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1にトリオレインを総脂質のmol%として0, 0.9, 1.8, 3.6, 7.0, 14.0 (コレステロールに対するmol%としては0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0) 混合し、実施例3と同様にしてCF封入リポソームを作成した。得られたリポソームの粒径と封入率を同様に測定した。

【0073】

その結果を図3に示す。CFの封入率はトリオレインの添加量が総脂質の1.8mol% (コレステロールの5mol%) 程度から向上し、総脂質の3.6mol% (コレステロールの10mol%) 程度で70%を超えほぼプラトーに達した。リポソームの粒径に関しては総脂質の0.9mol%で粒径低減効果が認められ、14mol%まで200nm未満であった。

【0074】

この結果より、封入率及び粒径の点からトリオレイン量が脂質総量の3.6mol%から7.0mol%が効果を発揮するのに良好であると考えられた。

【0075】

実施例11

リポソーム構成脂質として、DPPC/コレステロール/MC-DPPE/トリオレイン (1.8 : 1 : 0.05 : 0.1 モル比) からなる脂質混合物30, 45, 60, 75, 90, 105 mgを用い実施例2と同様にしてCF封入リポソームを作製した。その結果、CFの封入率は脂質量の増加に従い増加し、75mgの脂質量まで急激に封入率が増加し、その後の脂質量の増加では封入率の増加の程度はゆるやかであった。脂質量75mg以上では封入率>70%が得られた。一方、トリオレイン不含で同様にして作製したリポソームの場合は、使用する脂質量に従い封入率の増加が見られたものの、トリオレイン含有のものより封入率は低く、脂質量75mgでの封入率は約55%であった。

【0076】

この結果より、本スケールでの脂質混合物の量は75mgが適していることが明らかとなった。

【0077】

実施例12

75 mg (総脂質122.6 μ mol、DPPC:78.8 μ mol, Chol:43.8 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリオレインを添加した脂質混合物を用い、封入する水溶液をシスプラチン水溶液 (1.5 mg/mLでPBSに溶解) に変更した以外は実施例1と同様にしてリポソームを作製し、リポソームの粒径を測定した。作製したリポソームとフリーのシスプラチンをNAP-5カラム (Amersham社) により分画した。元のリポソームとリポソーム画分内のシスプラチンの含有量をICP-AES法で、脂質の量をHPLC法 (L-Column, THF:AcCN:H₂O = 2:1:2 0.1% TFA, 215 nm, 1 mL/min) により定量し、単位脂質当たりのシスプラチンの量を算出することにより封入率を求めた。

【0078】

その結果、粒径は134 nmでありシスプラチンの封入率が70%のリポソームが得ら

れた。

【0079】

実施例13

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリオレインを添加した脂質混合物を用い、封入する水溶液をアラビノースシトシン水溶液 (100 mg/mLでPBSに溶解) に変更した以外は実施例1と同様にしてリポソームを作製し、リポソームの粒径を測定した。実施例12と同様にして、フリーのアラビノースシトシンとリポソームを分けた。元のリポソームとリポソーム画分の脂質量をリン脂質テストWAKOにより定量し、脂質量を合わせた。同量の脂質を含むリポソームをSDSと60℃における加熱処理により壊し、各サンプル内に含まれるアラビノースシトシンの量を測定することにより封入率を算出した (270 nmにおける吸光度を測定)。

その結果、粒径が170 nmで封入率が80%のリポソームが得られた。

【0080】

実施例14

75 mg (総脂質122.1 μ mol、DPPC:77.2 μ mol, Chol:42.9 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する4.3 μ molのトリオレインを添加した脂質混合物を用い、封入する水溶液をブルーデキストラン水溶液 (100mg/mLでPBSに溶解、Pharmacia社) に変更した以外は実施例1と同様にしてリポソームを作製し、リポソームの粒径を測定した。作製したリポソームサンプルをPBSで等倍希釈し、4℃、15,000 rpmで一時間遠心した。この遠心後のサンプルの上澄みと元のサンプル内に含まれるブルーデキストランの量を比較することにより封入率を算出した。粒径は232 nmで、封入率は72.3%のリポソームが得られた。

【0081】

実施例15

1.5 g (総脂質2442 μ mol、DPPC:1544 μ mol, Chol:858 μ mol, MC-DPPE 40 μ mol) のPL-M1に、コレステロールの10mol%に相当する86 μ molのトリオレインを添加した脂質混合物を20 mLのクロロホルム/ヘキサン 1:1混液に溶解した。この脂質溶液にカルセイン (Calcein) 溶液 (PBSに溶解した10 mM Calcein 4000 μ Lに70%シュクロース666 μ Lを加えたもの:シュクロースの終濃度10%) を添加した。これを55℃の湯浴で温めながら、ホモジナイザーを用いて、出力5で20分間予備乳化を行なった。次に高压乳化機 (超微粒化卓上実験装置 YSNM-1500-0005、吉田機械興業株式会社) を用いて、吐出圧が30 MPaぐらいになるように調節しながら衝突型ジェネレーターを4回、6回又は8回通すことによって一次乳化を行った。

【0082】

一次乳化産物1 mLずつをサンプリングし、実施例1と同様にしてリポソームの調製を行い、リポソームの粒径と封入率を測定した。4回、6回、8回それぞれにおいて、粒径は117.3 nm、118.8 nm、121.7 nmで、封入率は82%、72.9%、74.3%のリポソームが得られた。

【0083】

実施例16

EPC 4.0mmolとコレステロール2.0mmol及びトリオレイン0.2mmolをジクロロメタンに溶解後、窒素気流下に乾燥し乾燥脂質混合物を調整した。

【0084】

調製した脂質乾固物を、クロロホルム/ヘキサン (1:1、V/V) 混液50 mLに溶解した。この脂質溶液に実施例1と同様にして調整したショ糖を含有したCF溶液 11.7 mLを添加した。混合した後、高压乳化機 (貫通型ジェネレーター装着ナノマイザー、吉田機械興業製) に3回通すことで1次乳化を行なった。

【0085】

その一部を用い、実施例1と同様に2次乳化及びリポソーム化を行なった。

【0086】

得られたリポソームの粒径を動的光散乱法により測定したところ161.3 nmであった。また封入率は73.4%であった。

【0087】

実施例 17

実施例 16 で作製したリポソームの10.2 μmol (総脂質量、マレイミド量としては178.2 nmol) にアミノ酸配列GRKKRRQRRPPQCからなるペプチド (以下TATペプチドと記載する) 11.1 nmolを加えて一晚反応させた後、セファロースCL4Bカラムを用いてリポソーム画分を精製した。得られたリポソームの脂質量をWAKOリン脂質定量キットを用いて定量した。リポソームサンプルをDMEM/F12培地で希釈し (脂質濃度として0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml)、ヒト肺癌細胞株 (HLC) と37℃で1.5時間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (FCM) 及び共焦点蛍光顕微鏡で細胞を観察した。FCM解析結果を図4に示す。TATを結合していないリポソームは細胞と反応しなかったが、TATを結合したリポソームは細胞と反応していることが確認された。また、同様に共焦点蛍光顕微鏡観察でもTAT非結合リポソームに比べTATリポソームで明らかな細胞との結合が観察され、一部の細胞はTATリポソームを細胞内に取り込んでいる様子が観察された。

【0088】

実施例 18

CFに換えてウシ血清アルブミン溶液11.7 ml (8.6 mg/ml 10%シュクロース含有溶液) を用いること以外は、実施例 16 と同様にしてリポソームを作製した。得られたリポソームは、セファロースCL6Bカラムを用いて精製することで非封入のアルブミンを除いた。得られたリポソームの粒径を動的光散乱法で測定したところ平均粒径は183 nmであった。また、リポソームの一部をSDS電気泳動に供しCBBで染色した。同様に既知量のアルブミンを電気泳動し検量線を作成し、アルブミン量を定量した。また、脂質量はリン脂質定量キット (和光純薬) を用い定量した。その結果、リポソームへの封入率は69%であった。

【0089】

実施例 19

DPPC 1.58mmol、コレステロール878 μmol 及びトリオレイン 88 μmol を添加した脂質混合物を30 mLのクロロホルム/ヘキサン1:1混液に溶解した。カルボキシメチルセルロース (ICN Biomedicals Inc, Low viscosity) (12.5mg/mlのPBS溶液) 6 mlにシスプラチン60 mgを添加して加温し溶解した。このシスプラチン/カルボキシメチルセルロース溶液4 mlに70%シュクロース666 μL を加え薬剤溶液とした。この薬剤溶液を上記脂質溶液に添加し予備乳化を行った後、実施例15と同様にナノマイザーを用いて一次乳化を行った。得られたエマルジョン用いて、実施例 1 と同様に2次乳化及びリポソーム化を行った。

【0090】

その結果、得られたリポソームの粒径を動的光散乱法により測定したところ163.8 nmであった。また封入率は77.6%であった。

【産業上の利用可能性】

【0091】

リポソームをDDSに応用する際に有用である内腔への水溶性物質の封入率が高いリポソーム及び/又は粒径の小さいリポソームを提供することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】 トリオレイン含有リポソーム (●) 及びトリオレイン不含有リポソーム (△) の粒径及び封入率を示す図である。図1A: 縦軸はリポソームの粒径、横軸は1次乳化の超音波照射の時間を示す。図1B: 縦軸はリポソームの封入率、横軸は超音波照射の時間を示す。

【図2】 電子顕微鏡によるCF封入リポソームの形態を観察した図である。CFを封入

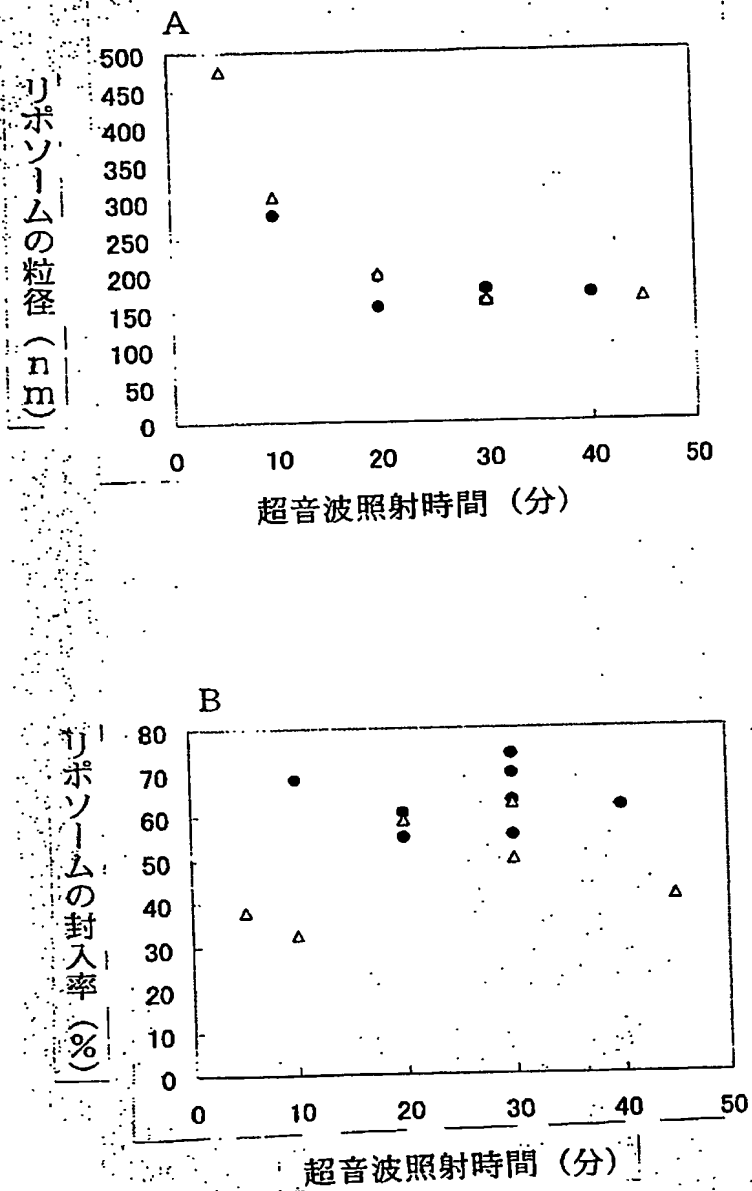
したPL-M1組成のリポソームの形態をネガティブ染色法により観察した。図2Aはトリオレイン含有リポソーム、図2Bはトリオレイン不含有リポソームを示す。

【図3】リポソームの粒径及び封入率に及ぼすトリオレイン量の影響について示した図である。図3A：縦軸はリポソームの封入率、横軸はトリオレインの添加量を総脂質に対するmol%として示す。図3B：縦軸はリポソームの粒径、横軸はトリオレインの添加量を総脂質に対するmol%として示す。リポソームの粒径は動的光散乱法により測定した平均粒径を示す。

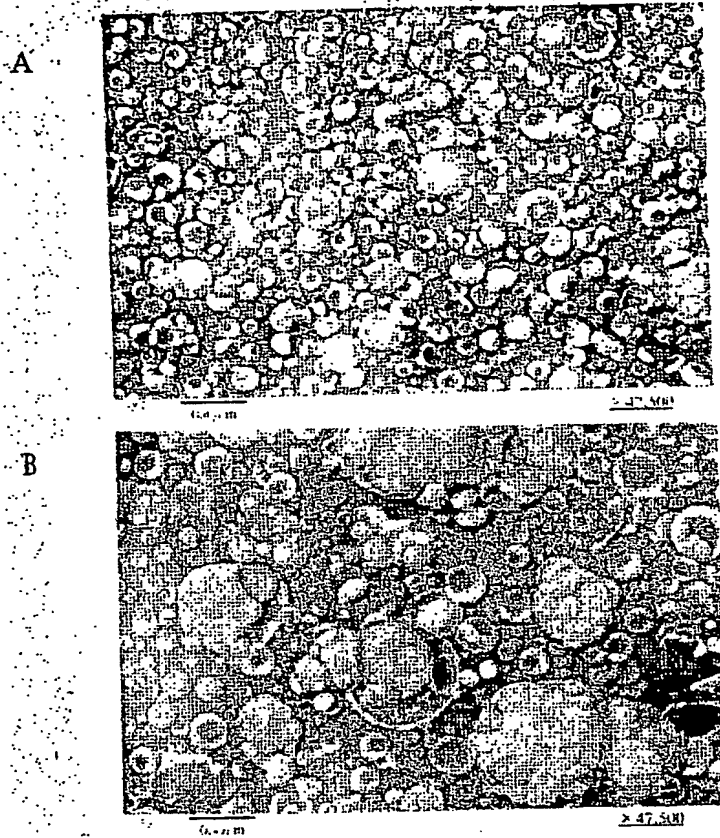
【図4】フローサイトメトリーによるリポソームと細胞の反応性を測定した図である。図4A：CFを封入したTAT結合リポソームとヒト肺癌細胞株との反応性、図4B：TATを結合していないCFを封入したリポソームとヒト肺癌細胞株との反応性。図4中、1はリポソームを添加しない細胞の蛍光を示す。2から5はそれぞれ、脂質量として1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/mlの各リポソームを細胞と反応して得られた蛍光量のシフトを示す。

【書類名】 図面

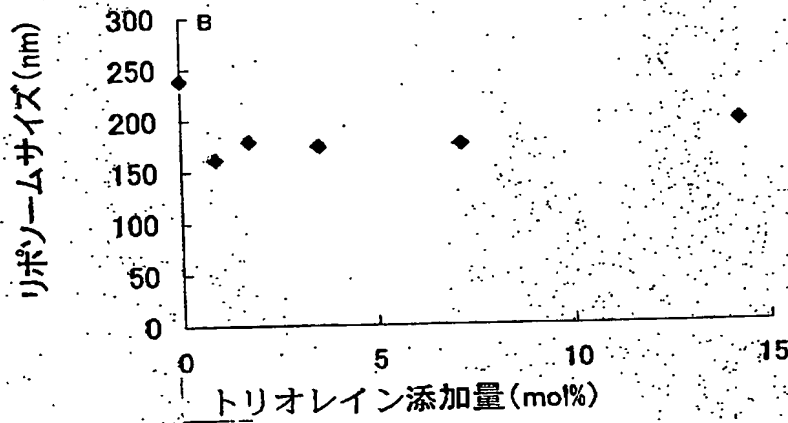
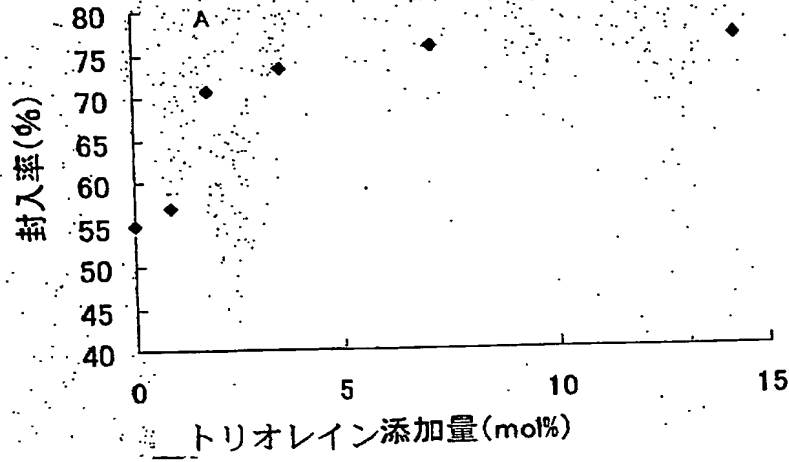
【図 1】



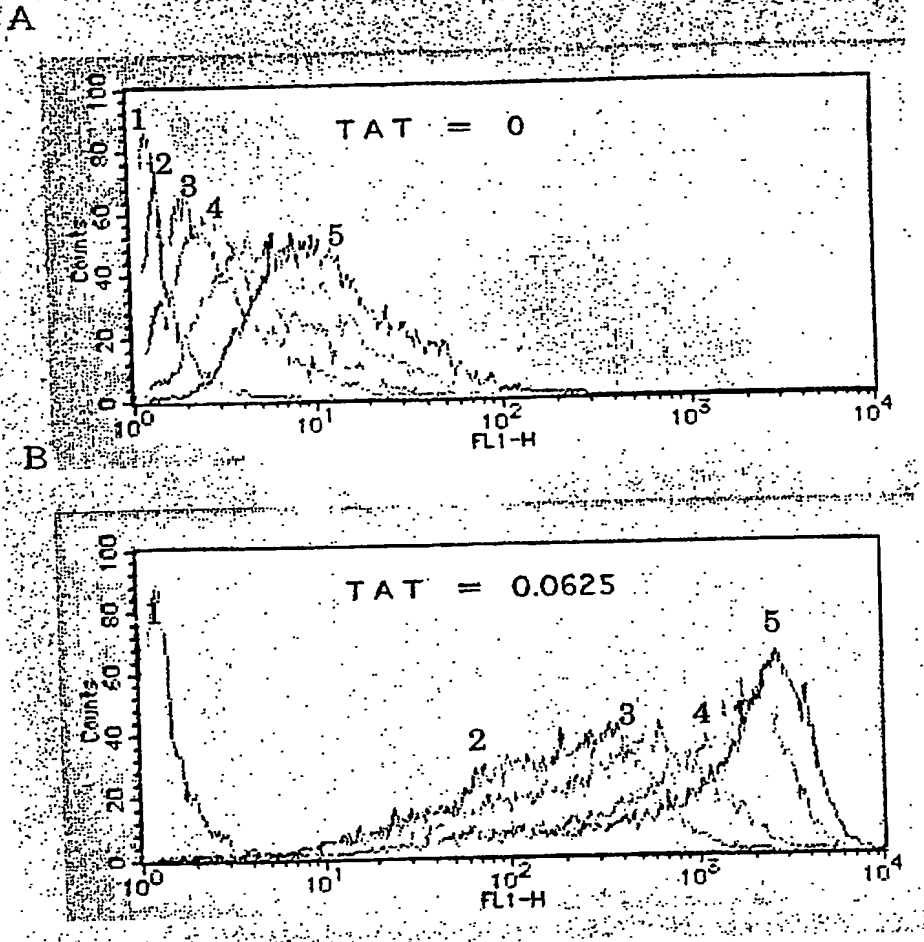
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DDSに応用する際に有用と考えられる、従来のリポソームに比べて、粒径が小さいリポソーム及び／又は内腔への水溶性物質の封入率が高いリポソームを提供する。

【解決手段】 トリグリセロールを添加することにより、従来のリポソームに比べて粒径が小さいリポソーム及び／又は水溶性物質の封入率が高いリポソームを提供することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-400986
受付番号	50301972856
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年12月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年12月 1日

特願 2003-400986

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006725]

1. 変更年月日

2001年10月 1日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号

氏 名

三菱ウェルファーマ株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017694

International filing date: 29 November 2004 (29.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-400986
Filing date: 01 December 2003 (01.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse